

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005540 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, G01N 33/574, C07K 16/18, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/001986

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juni 2003 (12.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 30 631.1 2. Juli 2002 (02.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): METAGEN PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERBERTH, Gunda [DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE). DAHL, Edgar [DE/DE]; Oudenarder Strasse 16, 13347 Berlin (DE).

(74) Anwälte: JUNGBLUT, Bernhard usw.; Albrecht, Lüke & Jungblut, Patentanwälte, Gelfertstrasse 56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/005540 A2

(54) Title: USES OF NGAL-BINDING SUBSTANCES IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER DISEASES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNGEN VON AN NGAL BINDENDEN SUBSTANZEN ZUR DIAGNOSE UND BEHANDLUNG VON KREBSERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to the uses of Ngal in the diagnosis and treatment of cancer and in the screening of substances for the purposes thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verwendungen von Ngal zur Diagnose und Behandlung von Krebs sowie zum Screenen nach Substanzen für solche Zwecke.

Verwendungen von an Ngal bindenden Substanzen zur Diagnose
und Behandlung von Krebserkrankungen.

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft neue Verwendungen von Ngal oder daraus abgeleiteten Sequenzen zum Screenen nach daran bindenden Substanzen, sowie die Verwendung von an Ngal bindenden Substanzen zur Diagnose und/oder Behandlung von Tumor-Erkrankungen.

Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

15

Ngal, auch Lipocalin-2 (LCN2) genannt, ist ein Protein, welches in den Granulozyten mit der neutrophilen Gelatinase assoziiert ist (L. Kjeldsen et al., J Biol Chem, 268:10432-10432 (1993) und weist ein Molekulargewicht von ca. 25 kD auf. Es wird vermutet, daß Ngal auf inflammatorische Reaktionen modulierend wirkt und an kleine lipophile Moleküle und Formylpeptide (fmlp), welche von Bakterien abgeleitet sind, bindet. Letzteres konnte allerdings von einer anderen Gruppe experimentell nicht bestätigt werden (D.H. Goetz et al., Biochemistry, 39:1935-1945 (2000)).

Ngal wurde durch Screenen einer humanen Genombibliothek mit Ngal cDNA als ein Gen mit 7 Exons identifiziert (J.B. Cowland et al., Genomics 45:17-23 (1997)). Das primäre Transkript hat eine Länge von 3696 Nukleotiden und das prozessierte Transkript ist 809 Nukleotide lang. In der Literaturstelle L. Kjeldsen et al., (2000) ist Expression

von Ngal in verschiedensten humanen Normalgeweben beschrieben worden. Ngal liegt auf Chromosom 9q34 (P. Chan et al., Genomics 23:145-150 (1994)). Klonierung und Expression humaner Ngal cDNA, welche aus Knochenmark und 5 Ovar Zelllinien stammt, ist in der Literaturstelle S. Bartsch et al., FEBS Lett 9:255-259 (1995), beschrieben.

Hohe Ngal Pegel wurden in Adenocarcinomen der Lunge, des Dickdarms und des Pankreas gefunden. Dagegen sind Ngal 10 Pegel in Renalzellcarzinoma verschiedener Subtypen und Prostatatumoren niedrig. Lymphoma und Thymustumore waren in immunhistochemischen Versuchen Ngal-negativ (A. Friedl et al., The Histochemical Journal 31:433-441 (1999)). Gemäß der Literaturstellen US-5,627,034, US-5,773,290 und 15 US-5,846,739 und US-A-726725 ist die Proliferation von Brustkrebszellen mit Ngal Überexpression korreliert. Ein Zusammenhang mit Ovartumor ist in der Literaturstelle WO-99/53040 offenbart.

20 Erkenntnisse aus gepaarten Tumor-/Normalgeweben sind für andere Krebsarten nicht bekannt.

Krebs, insbesondere Ovar-, Kolon-, Lungen- und Uteruskrebs ist eine mit zunehmendem Alter mit beachtlicher Incidenz 25 auftretende Erkrankung. Bislang wird diese Tumorerkrankung im wesentlichen pathologisch diagnostiziert und meist durch Entfernung behandelt. Die Entfernung von Organen hat verschiedene nachteilige Effekte auf einen Patienten. Eine verbesserte Diagnose und Behandlung dieser Krebsart, ins- 30 besondere ohne das Erfordernis einer Entfernung des Organes, ist daher in hohem Maße wünschenswert.

Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Diagnose und/oder zur Behandlung von Krebserkrankungen anzugeben sowie Mittel zu deren Identifizierung.

10 Grundzüge der Erfindung sowie bevorzugte Ausführungsbeispiele.

Die Erfindung lehrt die Verwendung einer für Ngal codierenden Nukleinsäure und/oder eines Ngal Peptids oder Proteins zur Detektion von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, oder zur Detektion eines Risikos der Erkrankung an Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine Gewebeprobe (des betreffenden Gewebes) auf Übertranskription von Ngal RNA oder auf Überexpression eines Ngal Proteins untersucht wird. Eine an für Ngal codierende Nukleinsäure oder eine an Ngal Protein oder Peptid bindende Detektorsubstanz, vorzugsweise enthaltend eine Reportergruppe, kann verwendet werden, wobei Bindung 25 besagter Nukleinsäure und/oder besagten Proteins oder Peptids an die Detektorsubstanz halbquantitativ oder quantitativ detektiert wird.

Die Erfindung lehrt weiterhin die Verwendung einer Ngal RNA oder eines Ngal Proteins oder Peptids zum Screenen nach daran bindenden Substanzen, insbesondere prospektiven Wirkstoffen zur Inhibierung von besagter RNA oder besagtem Protein oder Peptid oder prospektiven Detektorsubstanzen,

wobei eine prospektive Substanz oder eine Mischung solcher prospektiver Substanzen mit besagter RNA oder besagtem Protein oder Peptid kontaktiert wird, wobei mit einem Bindungsassay Bindungseignisse festgestellt werden, und 5 wobei eine bindende prospektive Substanz, ggf. nach Dekonvolutierung, als zur Detektion und/oder Behandlung von Krebs, insbesondere von Ovar- Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, geeignet selektiert wird.

10 Die Erfindung lehrt schließlich die Verwendung einer Ngal inhibierenden oder daran bindenden Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs. Die Substanz kann ein Antikörper sein, 15 welcher beispielsweise durch Immunisierung eines nicht-menschlichen Säugetiers mit einem Ngal Peptid oder Protein, oder mit Ngal cDNA, oder mit mit cDNA von Ngal transient oder stabil transfizierten Zellen (z.B. Tumorzelllinien, NIH3T3, CHO, COS), oder mit endogen Ngal 20 exprimierenden Tumorzellen oder mit in Insektenzellen hergestelltem Ngal erhältlich ist, oder ein Phage-Display Antikörper ist.

Die Substanz kann aber auch eine Mimikriverbindung eines 25 Antikörpers gegen ein Ngal Peptid oder Protein sein. Die Substanz kann schließlich ein Aptamer, eine antisense RNA, eine inhibitorische RNAi, oder ein Ribozym sein. Die Substanz kann zusätzlich eine zytotoxische und/oder immun-stimulierende Komponente tragen. Die pharmazeutische 30 Zusammensetzung kann zur systemischen oder lokalen Applikation in Tumorzellen enthaltendem Gewebe hergerichtet sein.

Die Erfindung läßt sich im Rahmen eines Verfahrens zur Diagnose einer Krebserkrankung, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, verwenden, wobei eine Detektorsubstanz in einer Ausführungsform mit einer 5 Reportergruppe in zu untersuchendes Gewebe appliziert wird, wobei das zu untersuchende Gewebe dann einer Detektionsverfahrensstufe unterworfen wird, welche sensitiv für die Reportergruppe ist, und wobei im Fall der Detektion eines definierten Mindestwertes der Reportergruppe im 10 Gewebe das Gewebe als Tumorzellen enthaltend qualifiziert wird, sowie eines Verfahrens zur Behandlung einer Krebserkrankung, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine erfindungsgemäße pharmazeutische 15 Zusammensetzung in einer physiologisch wirksamen Dosis einem Patienten dargereicht wird.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß Ngal, überexprimiert ist bzw. differenziell exprimiert wird in Tumoren, i.e. in besagten Tumorgeweben ist die Expression 20 höher, verglichen mit (gepaarten) normalen Zellen gleichen Gewebes, und der daraus herleitbaren technische Lehre, daß Ngal als Zielmolekül bei der Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung eingesetzt werden kann. Ngal kann also als Marker zur Identifizierung von Tumorzellen in den besagten 25 Tumorgeweben dienen. Auf der anderen Seite bietet die Inhibition von Ngal, insbesondere auch bei lokaler Applikation, die Möglichkeit, in die Tumor-spezifischen Ngal Assoziationen mit anderen Prozessen in den Tumorzellen einzugreifen und somit letztendlich den tumorzellenspezifisch veränderten Stoffwechsel zu stören und zu einem Absterben oder zumindest einer Wachstumshemmung der 30 Tumorzellen beizutragen.

Im Rahmen der Erfindung kann es sich empfehlen, im Vorfeld einer Behandlung mit einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung eine Probe aus einem Gewebe, welches als Tumorgewebe mit anderen Methoden identifiziert 5 ist, zu entnehmen und die Gewebeprobe auf Expression bzw. Überexpression von Ngal zu untersuchen. Alternativ kann mit einer erfindungsgemäßen Detektorsubstanz zur Diagnose in vivo auf Ngal Abhängigkeit getestet werden. Wird eine Expression bzw. Überexpression von Ngal gegenüber Normal-10 gewebe gleichen Typs festgestellt, so ist die Anwendung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung indiziert.

Handelt es sich bei dem Tumor um einem Typus, bei welchem 15 Tumorzellen Ngal exprimieren, Normalzellen gleichen Gewebetyps jedoch nicht, so ist es besonders bevorzugt, wenn die an Ngal bindende Substanz zusätzlich eine zytotoxische und/oder immunstimulierende Komponente trägt. Dies führt dann letztendlich dazu, dass praktisch ausschließlich Tumorzellen getötet werden, sei es durch die Zytotoxizität, sei es durch Angriff durch das stimulierte Immunsystem, während Normalzellen in dem Gewebe praktisch vollständig erhalten bleiben. In dieser Ausführungsform braucht die bindende Substanz selbst nicht inhibierend auf Ngal zu 20 wirken, da die bindende Substanz dann lediglich als Marker funktionieren muß, welcher die Komponenten zu Ziel-Tumorzellen trägt. Im Falle des Einsatzes einer zytotoxischen und/oder immunstimulierenden Komponente wird es sich besonders empfehlen, wenn die pharmazeutische Zusam-25 mensetzung zur lokalen Applikation in Tumorzellen enthaltendem Gewebe hergerichtet ist, beispielsweise zur 30 Injektion.

Von selbstständiger Bedeutung im Rahmen der Erfindung ist eine Verwendung eines Ngal Proteins in einem Screening Verfahren zur Findung von die Sekretion von Ngal modulierenden Substanzen. Dies kann beispielsweise dergestalt er-
5 folgen, daß Ngal exprimierende Zellen, insbesondere Ngal exprimierende Tumorzellen der genannten Tumorarten, in einem Medium kultiviert werden, wobei vor oder während der Kultivierung mit einer prospektiven, die Sekretion in-
hibierende Substanz oder mit einer Mischung solcher Sub-
10 stanzen inkubiert wird, wobei das Medium nach einer definierten Kultivierungsdauer auf Ngal analysiert wird, optional nach Abtrennung des Mediums von den Zellen, und wobei die Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird, wenn die Menge detektierten Ngal im Medium einen
15 definierten Grenzwert unterschreitet. Bei dieser Aus-
führungsform ist der tatsächliche Sekretionsweg irrele-
vant, da nur die Sekretion als solche das Selektionskriterium ist. Der definierte Grenzwert kann durch Kultivierung unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne
20 Inkubation mit einer prospektiven, die Sekretion inhibier-
enden Substanz, ermittelt werden. Als Selektionskriterium kann eine Sekretionsrate angesetzt werden, welche zumind-
est 10%, vorzugsweise zumindest 50%, höchstvorzugsweise zumindest 90%, unterhalb der Referenz-Sekretionsrate
25 liegt.

Von weiterhin selbstständiger Bedeutung ist die alterna-
tive Verwendung eines Ngal Proteins in einem Screening Verfahren zur Findung einer Ngal inhibierenden aber nicht
30 dessen Sekretion inhibierenden Substanz, wobei Ngal ex-
primierende Zellen in einem Medium kultiviert werden,
wobei vor oder während der Kultivierung mit einer gemäß Anspruch 3 selektierten Substanz oder mit einer Mischung

solcher Substanzen inkubiert wird, wobei das Medium nach einer definierten Kultivierungsdauer auf Ngal analysiert wird, optional nach Abtrennung des Mediums von den Zellen, und wobei die Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird, wenn die Menge detektierten Ngal im Medium 5 einen definierten Grenzwert überschreitet. Zu weiteren Ausbildungen gelten die vorstehenden Ausführungen analog.

Diese Ausführungsform der Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß sezerniertes Ngal in zumindest einigen Immunzellen, welche bei der Tumorabwehr eine Rolle spielen, Apoptose induziert. Insoweit hat Ngal parakrine Wirkung. Sezerniertes Ngal hat bezüglich der Proliferation von Tumorzellen jedoch auch autokrine Wirkung, i.e. Proliferation 15 wird durch sekretiertes Ngal induziert. Die Sekretion von Ngal hat folglich eine unerwünschten synergistischen Effekt, nämlich einerseits Proliferationsförderung im Falle der Tumorzellen und andererseits Induktion der Apoptose in Immunzellen, die Tumorzellen angreifen. Hieraus folgen grundsätzlich zwei therapeutische Ansätze, nämlich: 20 i) Inhibierung von Ngal in den Tumorzellen selbst, wodurch letztlich auch die Sekretion unterbleibt oder nur inaktives Ngal sekretiert wird, und/oder ii) Inhibierung von sekretiertem Ngal, i.e. außerhalb der Tumorzellen, wodurch 25 einerseits eine Induktion der Proliferation der Tumorzellen unterbleibt und andererseits die die Tumorzellen angreifenden Immunzellen vor Ngal induzierter Apoptose geschützt werden. Es ergeben sich somit potentielle Wirkstoffe mit den folgenden Grundeigenschaften: i) Inhibierung von Ngal in der Tumorzelle; hierfür muß der Wirkstoff membrangängig sein, ii) Inhibierung der Sekretion 30 von Ngal; ein solcher Wirkstoff greift nicht notwendigerweise (kann aber auch) in die intrazelluläre Ngal

Bildung ein, sondern inhibiert den Membrandurchtritt gebildeten Ngals, iii) Inhibierung von vorwiegend oder ausschließlich extrazellulären Ngal; ein solcher Wirkstoff ist nicht oder nur schlecht membrangängig (z.B. Antikörper). Letztendlich erfolgt somit neben der Inhibierung der pro-proliferativen Wirkung des Ngal auf Tumorzellen auch eine (Re-) Aktivierung der natürlichen Immunantwort auf den Tumor.

10 Im Rahmen der Erfindung ist auch gefunden worden, daß Tumorzellen (z.B. humane Ovartumorproben) praktisch ausschließlich Ngal in monomerer Form sezernieren, während beispielsweise Granulozyten und transfizierte Insektenzellen sowohl das Monomer als auch ein Dimer sezernieren.

15 Dies kann einerseits diagnostisch genutzt werden zum Nachweis von Tumorzellen und zwar durch Nachweis der Sezernierung überwiegend oder ausschließlich als Monomer. Des Weiteren kann eine therapeutische Nutzung dadurch erfolgen, daß beispielsweise eine Dimerisierung, als Homo- oder 20 als Heterodimer, induziert wird, wobei das so induzierte Dimer biologisch inaktiv bzw. inaktiviert ist.

Definitionen.

25

Im Rahmen dieser Beschreibung wird die Bezeichnung Ngal für alle humanen Isoformen, bekannt oder neu, auf Nukleinsäuren- oder Aminosäurenbasis, verwendet. Mit diesen Begriffen mit umfaßt sind auch die im Rahmen dieser 30 Beschreibung offenbarten kurzen Sequenzen, welche aus den Isoformen stammen, beispielsweise Immunisierungssequenzen. Weiterhin mit umfaßt sind auch Homologe, wobei die Homologie zumindest 80%, vorzugsweise mehr als 90%,

höchstvorzugsweise mehr als 95%, beträgt. Im Falle der Nukleinsäuresequenzen sind auch komplementäre oder allelische Varianten mit umfaßt. Weiterhin sind Sequenzen umfaßt, welche lediglich Teilsequenzen der explizit offensichtlichen Sequenzen, beispielsweise ein Exon oder mehrere Exons, oder komplementärer Sequenzen hierzu darstellen, mit der Maßgabe, daß diese Teilsequenzen im Falle der Nukleinsäuren eine für eine Hybridisierung mit einer erfundungsgemäßen Nukleinsäure hinreichende Länge, zumindest 5 50 Basen, aufweisen und im Falle der Proteine bzw. Peptide mit zumindest gleicher Affinität an ein protein- oder peptidspezifisches Zielmolekül binden. Weiterhin sind alle mit erfundungsgemäßen Nukleinsäuren hybridisierende Nukleinsäuren umfaßt, nämlich solche, die unter stringenten 10 Bedingungen (z.B. 5°C bis 25°C unterhalb der Aufschmelztemperatur; siehe ergänzend J.M. Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) und E.M. Southern, J Mol Biol, 98:503ff (1975)) hybridisieren. Es versteht sich, daß die Erfundung auch Expressionskassetten umfaßt, i.e. eine oder mehrere der 15 erfundungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit mindestens einer Kontroll- oder regulatorischen Sequenz. Eine solche Expressionskassette kann auch eine Sequenz für ein bekanntes Protein umfassen, wobei im Zuge der Translation 20 ein Fusionsprotein aus einem bekannten Protein und einem erfundungsgemäßen Protein oder Peptid entsteht. Ebenso sind auch antisense Sequenzen zu den vorstehenden Nukleinsäuresequenzen umfaßt. Schließlich sind RNA sowie damit korrelierende DNA und umgekehrt umfaßt, ebenso wie geno- 25 mische DNA als auch korrelierte cDNA und umgekehrt. 30

Im Zusammenhang mit erfundungsgemäßen Verwendungen umfassen die Begriffe der Ngal Nukleinsäuren oder Proteine bzw.

Peptide neben den Vollängen der offebarten Sequenzen (siehe auch vorstehender Absatz) auch Teilsequenzen heraus, und zwar mit einer Mindestlänge von 12 Nukleotiden, vorzugsweise 30 bis 90 Nukleotiden, im Falle der Nuklein-
5 säuren und einer Mindestlänge von 4 Aminosäuren, vorzug-
weise 10 bis 30 Aminosäuren, im Falle der Peptide oder Proteine.

Die Begriffe der Detektion und/oder der Behandlung von
10 Tumorerkrankungen, insbesondere der angegebenen Tu-
morarten, umfassen auch die Detektion und/oder Behandlung
von Metastasen aus Primärtumoren in sonstigen Geweben. Der
Begriff der Behandlung umfaßt auch die Prophylaxe.

15 Als Inhibitor ist eine Verbindung oder Substanz bezeich-
net, welche entweder die Bildung von Ngal inhibiert oder
gebildetes Ngal in der Aktivität reduziert, bezogen auf
die Ngal Aktivität in Abwesenheit des Inhibitors. Insofern
kann ein Inhibitor einerseits eine Substanz sein, welche
20 in der Entstehungskaskade von Ngal inhibierend eingreift.
Auf der anderen Seite kann ein Inhibitor eine Substanz
sein, welche mit gebildetem Ngal eine Bindung eingeht, und
zwar dergestalt, dass weitere physiologische Wechsel-
wirkungen mit endogenen Substanzen zumindest reduziert
25 sind.

Mimikry-Moleküle sind Verbindungen, die den variablen
Bereich, insbesondere den Bindungsbereich eines Antikör-
pers, nachbilden und an gleicher Stelle eines Zielmoleküls
30 binden, wie der zu Grunde liegende Antikörper.

Der Begriff der Antikörper umfaßt polyklonale Antikörper,
monoklonale Antikörper, nicht-humane, humane und

humanisierte Antikörper, sowie Phage-Display-Antikörper, aber auch chimäre Antikörper und antiidiotypische Antikörper sowie spezifische Fragmente der leichten und/oder der schweren Kette des variablen Bereiches zu Grunde liegender 5 Antikörper vorstehender Art. Die Herstellung bzw. Gewinnung solcher Antikörper mit vorgegebenen Immunogenen ist dem Durchschnittsfachmann wohl vertraut und braucht nicht näher erläutert zu werden. Weiterhin umfaßt der Begriff der Antikörper bispezifische Antikörper. Bispezifische 10 Antikörper kombinieren eine definierte Immunzellaktivität mit einer spezifischen Tumorzellerkennung, wodurch Tumorzellen getötet werden. Ein bispezifischer Antikörper bindet einerseits an ein Auslösemolekül der Immun- 15 Effektorzelle (z.B. CD3, CD16, CD64) und andererseits an Antigene der Tumorzielzelle.

Die galenische Herrichtung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung kann in fachüblicher Weise erfolgen. Als Gegenionen für ionische Verbindungen kommen 20 beispielsweise Na^+ , K^+ , Li^+ oder Cyclohexylammonium infrage. Geeigente feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulat, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro-) Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen 25 (i.v., i.p., i.m.) sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler, Verwendung finden. 30 Als Hilfsstoffe sei Magnesiumcarbonat, Titandioxyd, Lactose, Mannit und andere Zucker, Talcum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Zellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuss-

oder Sesamöl, Polyethylenglycole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, beispielsweise Glycerin, genannt. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist dadurch herstellbar,
5 dass mindestens ein erfindungsgemäß verwendeter Ngal In-
hibitor in definierter Dosis mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und ggf. weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen mit definierter Inhibitordosis gemischt und zu der gewünschten
10 Darreichungsform hergerichtet ist.

Tumorzellen exprimieren Ngal differenziell, wenn Normalzellen des gleichen Gewebetyps dieses nicht exprimieren. Tumorzellen überexprimieren Ngal spezifisch bzw. differen-
15 ziell, wenn Ngal im Vergleich zu Normalzellen des gleichen Gewebes zumindest in doppelter Menge exprimiert wird.

Zytotoxische Komponenten bzw. Gruppen sind Verbindungen, welche direkt oder indirekt Apoptose einleiten bzw. zu
20 Nekrose führen oder zumindest wachstumshemmend wirken. Solche Gruppen bzw. Verbindungen können neben Radioiso-
topen (z.B. 188Re, 213Bi, 99mTc, 90Y, 131I, 177Lu) insbe-
sondere Zytostatika sein, welche in der Tumortherapie eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind: Alkytiantien
25 (z.B. Mechlorethamin, Ifosfamid, Chlorambucil, Cyclophos-
phamid, Melphalan, Alkylsulfonate, Busulphan, Nitroso-
harnstoffe, Carmustin, Lomustin, Semustin, Triazene,
Dacarbazin), Antimetaboliten (z.B. Folsäure-Antagonisten,
Methotrexat, Pyrimidin-Analoga, Fluoruracil, Fluord-
30 esoxyuridin, Cytarabin, Gemcitabin, Purin-Analoga, Mercap-
topurin), Mitosehemmer (z.B. Vincaalkaloide, Voncristin,
Vinblastin, Paclitaxel, Docetaxel, Protaxel), Epipodophyl-
lotoxine (z.B. Etoposid, Teniposid), Antibiotika (z.B.

Dactinomycin, Daunorubicin, Idarubicin, Anthracycline, Bleomycin, L-Asparaginase), Platinkomplexverbindungen (z.B. Cisplatin), Hormone und verwandte Verbindungen (z.B. Nebennierenrindensteroide, Aminoglutethimid, Gestagene, 5 Östrogene, Androgene, Antiöstrogene, Tamoxifen, Steriodanaloge, Flutamid). Bei Bindung einer solchen Verbindung mit einer an ngal bindenden Substanz erfolgt die Kopplung dergestalt, daß die Affinität zu ngal um nicht mehr als 90%, vorzugsweise 50%, bezogen auf die Substanz ohne zyto-10 statische Gruppe, reduziert ist und die zytostatische Wirkung der Gruppe um nicht mehr als 90%, vorzugsweise 50%, bezogen auf die Verbindung ohne Substanz, reduziert ist.

15 Eine immunstimulierende Komponente ist meist ein Protein oder ein wirksamer Bestandteil hiervon, welches Zellen des Immunsystems stimuliert. Beispiele hierfür sind: Zytokine, wie M-CSF, GM-CSF, G-CSF, Interferone, wie IFN-alpha, -beta, -gamma, Interleukine wie IL-1 bis -16 (außer -8), 20 human LIF, Chemokine wie Rantes, MCAF, MIP-1-alpha, -beta, NAP-1 und IL-8.

Eine Reportergruppe ist ein Atom, Molekül oder eine Verbindung, welche in Verbindung mit einem hierauf abgestellten Assay den Nachweis der Reportergruppe und der somit mit der Reportergruppe verbundenen Verbindung oder Substanz ermöglicht. Beispiele für Reportergruppen und hiermit assoziierte Detektionsmethoden sind: ³²P-Labeling und Intensitätsmessung mittels Phosphoimager. Viele weitere 30 Beispiele sind dem Durchschnittsfachmann bekannt und bedürfen nicht der detaillierten Aufzählung.

Eine an Ngal bindende Substanz kann eine Substanz sein, welche ein Ngal Protein oder eine Ngal RNA bindet.

Im Rahmen der vorstehenden Definition gegenüber dem engen
5 Wortsinn erweiterte Begriffsbestimmungen umfassen auch die
bestimmten Begriffe im engen Wortsinn.

Optional können die Indikationen Brustkrebs oder Ovarkrebs
in bestimmten Zusammenhängen, insbesondere im Falle von
10 Sequenzidentität von Teilsequenzen, insoweit aus-
geschlossen sein.

Beispiele.

15

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich
bevorzugte Ausführungsformen darstellenden Beispielen und
Figuren näher erläutert. Es zeigen:

20 Figur 1: Cancer profiling array zur Überexpression in
Uterustumorgewebe,

Figur 2: Quantitative Auswertung zum Gegenstand der Figur
1,

25

Figur 3: verschiedene Hammerhead Ribozyme gegen Ngal,

Figur 4: verschiedene antisense RNA gegen Ngal,

30 Figur 5: inhibitorische RNA (RNAi) gegen Ngal,

Figur 6: Ngal-Sequenzen, Aminosäuresequenz (Seq.-ID 1,
6a) mit Markierung geeigneter

Immunisierungssequenzen (Seq.-ID 3 und 4) und
Nukleinsäuresequenz (Seq.-ID 2),

Figur 7: Western Blot von Lysaten und Zellkulturüber-
5 ständen verschiedener Ngal exprimierender
Zelllinien,

Figur 8: immunhistochemischer Nachweis von 2 Uteruskarzi-
10 nomen, und

Figur 9: Proliferationsassay in einer Kolontumorzelllinie.

15 Beispiel 1: Ngal Überexpression in Uterustumorgewebe.

Die Ngal Codierungssequenz wurde mit 32P durch random hexamer priming gelabelt und auf ein cancer profiling array von Clontech, welches 240 cDNA Bibliothekspaare enthält, wobei jedes Paar für jeweils ein Tumor- und ein Normalgewebe eines Patienten steht. Die Ergebnisse sind in der Figur 1 gezeigt. Man erkennt, daß ein Überexpression in Uterustumorgewebe, verglichen mit Normalgewebe, stattfindet. Dieser Befund ist quantifiziert in der Figur 25 2. Demach zeigen 56% (25 aus 44) der untersuchten Uterusgewebepaare eine zumindest 2-fache Überexpression von Ngal.

30 Beispiel 2: Nachweis von Ngal mittels Antikörpern

In diesem Beispiel wird die Markierung eines Tumors bzw. seiner Metastasen durch einen anti-Ngal-Antikörper in vivo

(Mausmodell) beschrieben. Ein anti-Ngal-Antikörper wird mit einem Markermolekül (z. B. Radioisotop) markiert. In NMRI-Nacktmäuse werden $1-2 \cdot 10^6$ Ngal-transfizierte humane Zellen transplantiert. 30 Tage nach der Transplantation wird den Mäuse markierter Antikörper injiziert. Die Kontrolltiere werden mit einem nicht relevanten Antikörper behandelt. Wenige Stunden nach der Antikörperapplikation werden die Tiere getötet und aus allen Organen Gewebschnitte angefertigt. Diese Schnitte werden auf die Gegenwart von markiertem anti-Ngal Antikörper untersucht.

Bei den anti-Ngal Antikörpern handelt es sich um polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen humanes Ngal Protein, durch cDNA-Immunisierung oder konjugiert mit einem Trägerprotein, in Ratte oder Kaninchen gezogen und affinitätsgereinigt.

Geeignete Immunisierungssequenzen sind in der Figur 6a sowie den Sequenzen Seq.-ID 3 und 4 angegeben. Auch kann mit der Vollängen cDNA (Fig. 6b) gearbeitet werden.

Beispiel 3: Immunhistochemischer Nachweis von Tumorzellen.

Primäre Tumoren werden aus den Patienten mit Uterus- und/oder Ovarumoren isoliert und als Paraffin bzw. Gefrierschnitte präpariert. Diese Schnitte werden mit einem anti-Ngal-Antikörper auf die Überexpression von Ngal in Tumorzellen untersucht. Die immunhistologische Untersuchung mit dem Ngal-Antikörper zeigt höhere Expression von Ngal in den Tumorzellen im Vergleich zu umliegenden Normalgewebe. Die Untersuchung erfolgt im Einzelnen durch Inkubation mit dem anti-Ngal Antikörper als primärem

Antikörper aus Kaninchen oder Ratte, einem biotinyliertem sekundären anti-Kaninchen oder anti-Ratten Antikörper und einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase. Die Färbung erfolgt mit mit AEC als chromogenen Substrat (rote 5 Färbung). Die Gegenfärbung erfolgt mit Hemalaun-Lösung (blaue Färbung). Es sind maligne und nichtmaligne Zellen unterscheidbar, wobei die malignen Zellen eine starke Färbung, i.e. hohen Ngal Gehalt, aufweisen, während die nichtmalignen Zellen nur moderat gefärbt sind.

10

In den Figuren 8a,b sind Ergebnisse mit anti-Ngal Antikörpern aus der Ratte in zwei Uteruskarzinomen (Paraffinschnitte) dargestellt. Jeweils unten sind Schnitte mit anti-Ngal Antikörpern zu sehen, während jeweils oben 15 zugeordnete Negativkontrollen mit einer Färbung mit Prä-Immunserum aus der Ratte dargestellt sind.

Beispiel 4: RNA-Inhibitoren

20

In der Figur 3 sind verschiedene Hammerhead Ribozyme dargestellt, die Ngal an den dargestellten Stellen schneiden und so die Aktivität eventueller Translationsprodukte inhibieren oder zumindest reduzieren (Seq.-ID 5 und 6; 25 Hammerhead).

Die Figur 4 zeigt verschiedene antisense Sequenzen für Ngal RNA (Seq.-ID 7 und 8).

30 Figur 5 zeigt ein PCR-Produkt für die Generierung von Ngal-Spezifischen, doppelsträngigen RNAi. In Fettdruck sind PCR-Primer für die Generierung von RNAi Proben dargestellt. In Großbuchstaben ist ein T7 RNA-Polymerase

Promotor und Kleinbuchstaben eine Ngal-spezifische Nukleotidsequenz dargestellt.

5 Beispiel 5: Sekretion von Ngal

Es wurden Kolontumorzelllinien (HT29) und Ovartumorzelllinien (SKOV3 und OV90) in 0,5% FCS-haltigem Zellkulturmedium kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von 10 Stunde sowie 12 Stunden wurden Kulturüberstände entnommen und mit einem Filter aufkonzentriert. Nach einer Proteinbestimmung wurden 16 μ g/ μ l Protein / Laufbahn auf ein 12%iges BisTris-Gel aufgetragen. Mit Ngal-spezifischen Antikörpern aus Ratte oder Kaninchen wurde auf dem Blot 15 die 25 kD Bande für Ngal identifiziert. Die Ergebnisse (anti-Ngal Antikörper aus Ratte) sind in der Figur 7 dargestellt (SN = Überstand, lys = Lysat). Man erkennt, daß in den Überständen der Zelllinien HT29 und SKOV3 eine Anreicherung von Ngal stattgefunden hat. Folglich wird 20 Ngal konstitutiv sezerniert.

Beispiel 6: Proliferationsassay an Kolontumorzelllinie.

25 Zellen der Kolontumorzelllinie HT29 wurden ohne besondere Zugabe, mit EGF (10 ng/ml), mit HGF (20 ng/ml) und mit Ngal (= ot115) in Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, oder 200 ng/ml für 72 h inkubiert. Die Proliferation wurde mittels des MTT Assays bestimmt. Dieser Assay beruht auf der Reduktion von Tetrazoliumsalz zu Formazan in metabolisch aktiven Zellen. Die Auswertung erfolgte photometrisch. Man erkennt, daß Ngal eine mit EGF oder HGF vergleichbare Wirkung zeigt, i.e. daß 30

20

extrazellulär vorliegendes Ngal die Proliferation der Tu-
morzellen fördert.

5

10

15

20

25

30

Patentansprüche:

1. Verwendung einer für Ngal codierenden Nukleinsäure
5 und/oder eines Ngal Peptids oder Proteins zur Detektion von Krebs, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, oder zur Detektion eines Risikos der Erkrankung an Krebs, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine Gewebeprobe auf
10 Übertranskription von Ngal RNA oder auf Überexpression eines Ngal Proteins untersucht wird.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei eine an für Ngal codierende Nukleinsäure oder eine an Ngal Protein oder Peptid bindende Detektorsubstanz, vorzugsweise enthaltend eine Reportergruppe, verwendet wird, wobei Bindung besagter Nukleinsäure und/oder besagten Proteins oder Peptids an die Detektorsubstanz halbquantitativ oder
20 quantitativ detektiert wird.

3. Verwendung einer Ngal RNA oder eines Ngal Proteins oder Peptids zum Screenen nach daran bindenden Substanzen,
25 insbesondere prospektiven Wirkstoffen zur Inhibierung von besagter RNA oder besagtem Protein oder Peptid oder prospektiven Detektorsubstanzen, wobei eine prospektive Substanz oder eine Mischung solcher prospektiver Substanzen mit besagter RNA oder besagtem Protein oder Peptid kontaktiert wird, wobei mit einem Bindungsassay Bindungsereignisse festgestellt werden, und wobei eine bindende prospektive Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird.

4. Verwendung einer Ngal inhibierenden oder daran bindenden Substanz, vorzugsweise einer gleichzeitig die 5 Sekretion von Ngal nicht inhibierenden Substanz, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs.

10

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Substanz ein Antikörper ist, welcher durch Immunisierung eines nichtmenschlichen Säugetiers mit einem Ngal Peptid oder Protein, oder mit Ngal cDNA, oder mit mit cDNA von Ngal 15 transient oder stabil transfizierten Zellen, insbesondere Tumorzelllinien, NIH3T3, CHO, COS, oder mit endogen Ngal exprimierenden Tumorzellen oder mit in Insektenzellen hergestelltem Ngal erhältlich ist, oder ein Phage-Display Antikörper ist.

20

6. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Substanz eine Mimikriverbindung eines Antikörpers gegen ein Ngal Peptid oder Protein ist.

25

7. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die Substanz, ein Aptamer, eine antisense RNA, oder ein Ribozym ist.

30

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei die Substanz zusätzlich eine zytotoxische und/oder immunstimulierende Komponente trägt.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zur systemischen oder 5 lokalen Applikation in Tumorzellen enthaltendem Gewebe hergerichtet ist.

10. Verfahren zur Diagnose einer Krebserkrankung, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine Detektorsubstanz in einer Ausführungsform mit einer Reportergruppe in zu untersuchendes Gewebe appliziert wird, wobei das zu untersuchende Gewebe dann einer Detektionsverfahrensstufe 15 unterworfen wird, welche sensitiv für die Reportergruppe ist, und wobei im Fall der Detektion eines definierten Mindestwertes der Reportergruppe im Gewebe das Gewebe als Tumorzellen enthaltend qualifiziert wird.

20

11. Verfahren zur Behandlung einer Krebserkrankung, insbesondere vom Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs, wobei eine pharmazeutische Zusammensetzung nach 25 einem der Ansprüche 4 bis 9 in einer physiologisch wirksamen Dosis einem Patienten dargereicht wird.

12. Verwendung eines Ngal Proteins in einem Screening Verfahren zur Findung von die Sekretion von Ngal 30 modulierenden Substanzen.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei Ngal exprimierende Zellen in einem Medium kultiviert werden, wobei vor oder während der Kultivierung mit einer prospektiven, die Sekretion inhibierende Substanz oder mit einer Mischung solcher Substanzen inkubiert wird, wobei das Medium nach einer definierten Kultivierungsdauer auf Ngal analysiert wird, optional nach Abtrennung des Mediums von den Zellen, und wobei die Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird, wenn die Menge detektierten Ngal im Medium einen definierten Grenzwert unterschreitet.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der definierte Grenzwert durch Kultivierung unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Inkubation mit einer prospektiven, die Sekretion inhibierenden Substanz bestimmt wird.

15. Verwendung einer mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14 selektierten Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs.

16. Verwendung eines Ngal Proteins in einem Screening Verfahren zur Findung einer Ngal inhibierenden aber nicht dessen Sekretion inhibierenden Substanz, wobei Ngal exprimierende Zellen in einem Medium kultiviert werden, wobei vor oder während der Kultivierung mit einer gemäß Anspruch 3 selektierten Substanz oder mit einer Mischung solcher Substanzen inkubiert wird, wobei das

Medium nach einer definierten Kultivierungsdauer auf Ngal analysiert wird, optional nach Abtrennung des Mediums von den Zellen, und wobei die Substanz, ggf. nach Dekonvolution, selektiert wird, wenn die Menge 5 detektierten Ngal im Medium einen definierten Grenzwert überschreitet.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der definierte 10 Grenzwert durch Kultivierung unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Inkubation mit einer prospektiven, die Sekretion inhibierenden Substanz bestimmt wird.

15 18. Verwendung einer mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 12, 13 oder 14 selektierten Substanz zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Krebs, insbesondere von Ovar-, Kolon-, Lungen- und/oder Uteruskrebs.

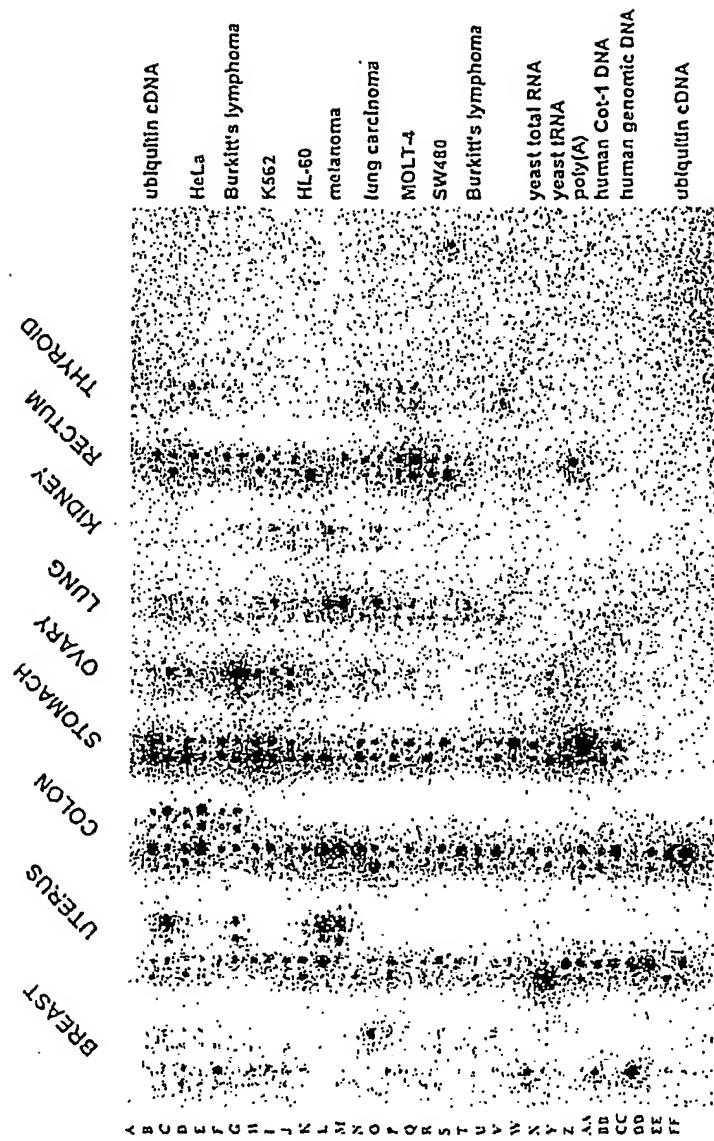
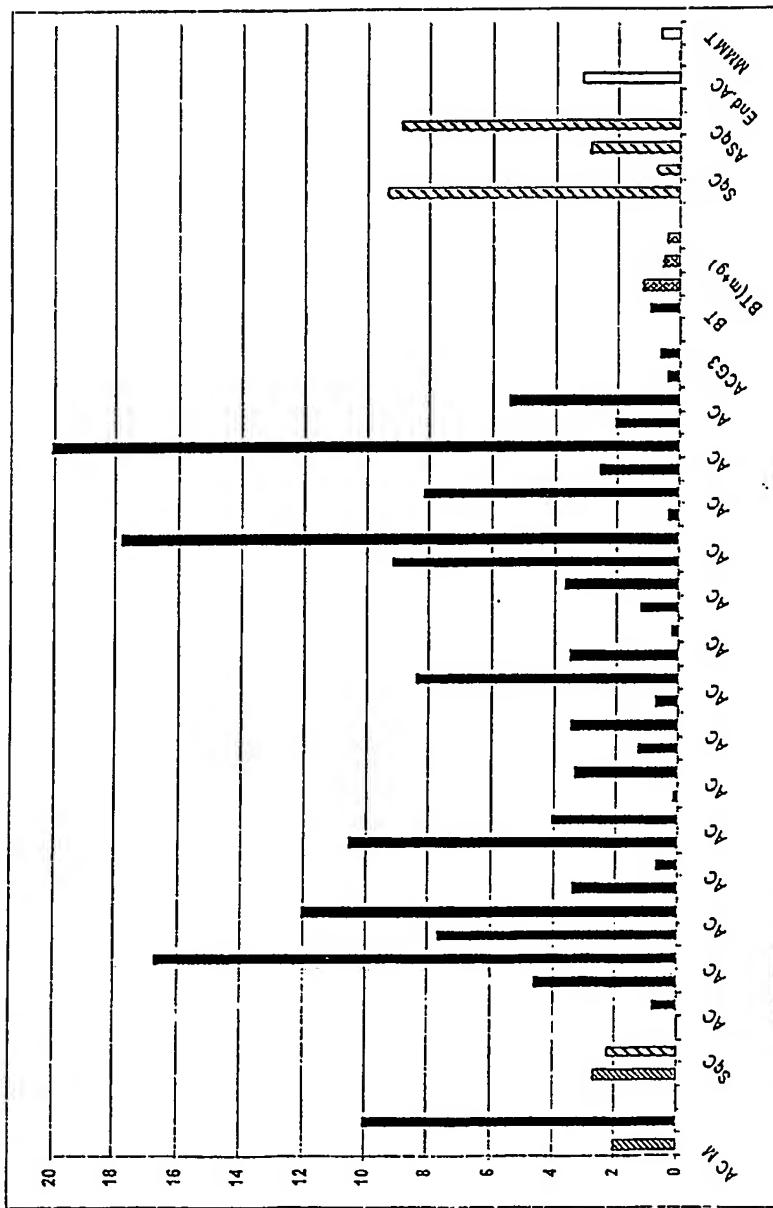


Fig. 1

Fig. 2



AC = adenocarcinoma
AC M = adenocarcinoma metastatic
SqC = squamous cell carcinoma
SqC M = squamous cell carcinoma metastatic
BT = benign tumor uterus

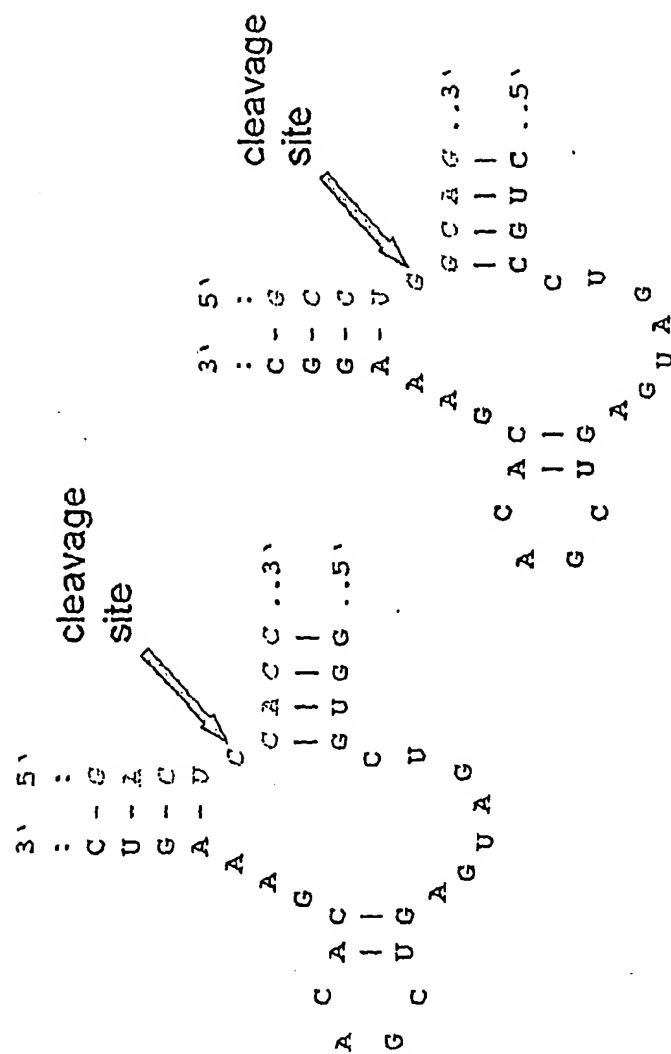


Fig. 3

NGAL-AS-1
CUAGGCCAGCCACAGGAGACCUAG

NGAL-AS-2
CCUGGGCAUGCAGAGCCCCAACAG

Fig. 4

1 GAATTAAATAACGACTCACTATAGGGAGActccacccatcagaccgtatcccaag 50
51 ccccacccctcgagcaaggtcgcctctgcagaacttccaggacaaccaa 100
101 ttccaggggaaagtggatgtgttggcctggcaggaaatggcaattctcag 150
151 agaagacaaaggccgcaaaagatgtatgcaccatctatggctgaaag 200
201 aagacaaggactacaatgtcacctccgtccgttttagaaaaagaagtgt 250
251 gactactggatcaggacttttgtccagggttgcgcaggccggagttcac 300
301 gctggcaacattaaagagttaaccctggattaacgaggtaacctcgccgag 350
351 tggtagccacaactacaaccaggcatgttatggtgttcaagaaattt 400
401 tctcaaaaacaggaggacttcaagatcacccctctacggagaaccaagga 450
451 gctgacttcggaaacttccatccgccttccaaatctctgg 500
501 gcctccctgtaaaaaccacatcgttccctgtctCTCCCTATAGTGAGTCG 550
551 TATTAATTTC 559

Fig. 5

Peptidsequenzen für die Kaninchenimmunisierung:

10	20	30	40	50	60	70
MPLGLLWPLSLLGAHQAQDSTS	APPLSKVPLQQNFQDNQEQGK	WVVGLAGNA	ILREDDKD	PQKM		
<u>YATIYELKEDKS</u>	<u>SYNVT</u>	<u>SVLFRKKKC</u>	<u>DYWIRTFVPGC</u>	<u>QPGEFTLGN</u>	<u>NIKSYPGLTSYLV</u>	<u>RVVSTNYNQHAMV</u>
<u>FFKKV</u>	<u>SQNREY</u>	<u>FKITLYGRT</u>	<u>KELTSEL</u>	<u>KENFIRFSKS</u>	<u>LGOPENHIVFPVPI</u>	<u>DQCIDG</u>

Fig. 6a

Fig. 6b

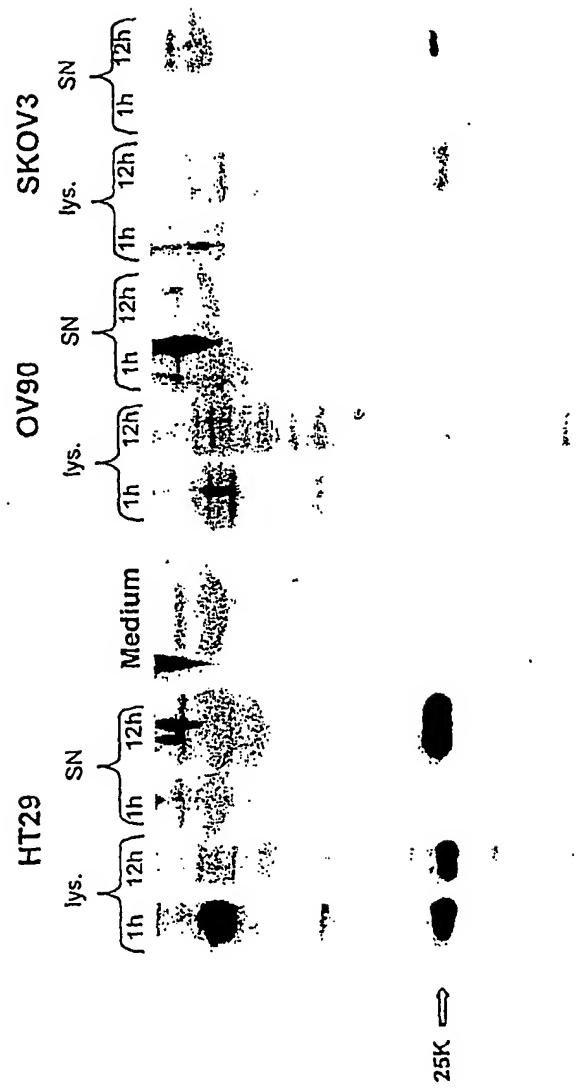
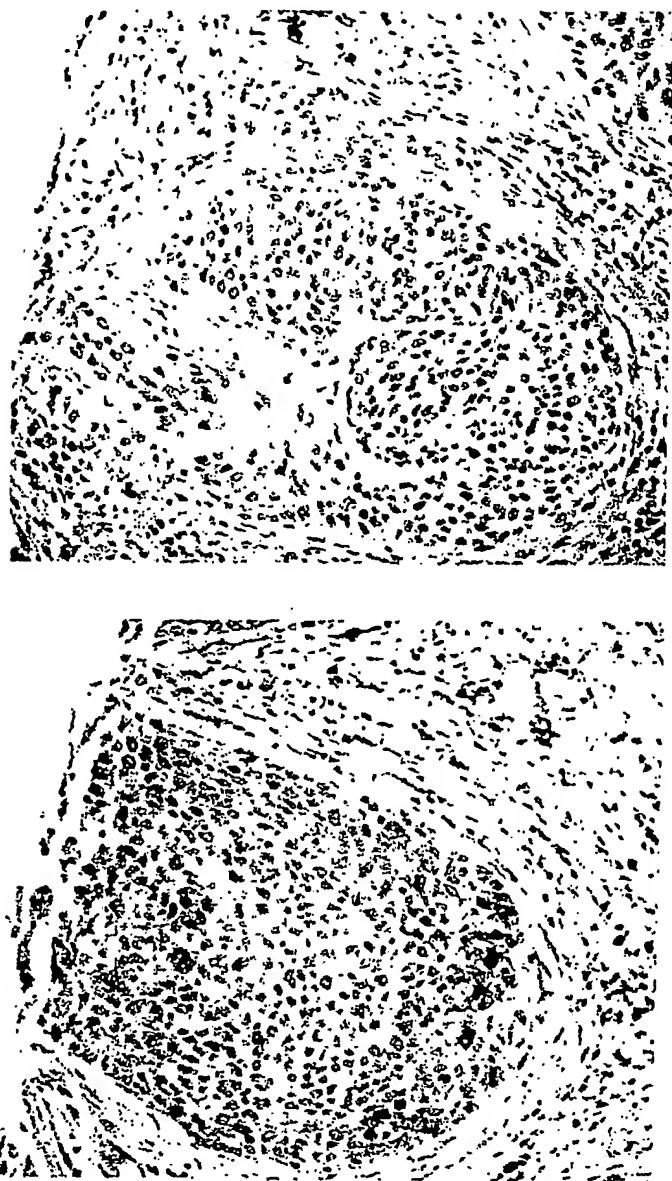
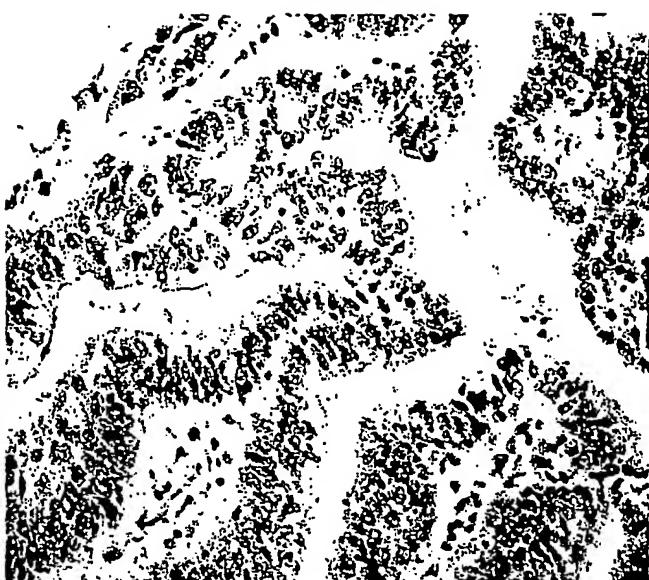


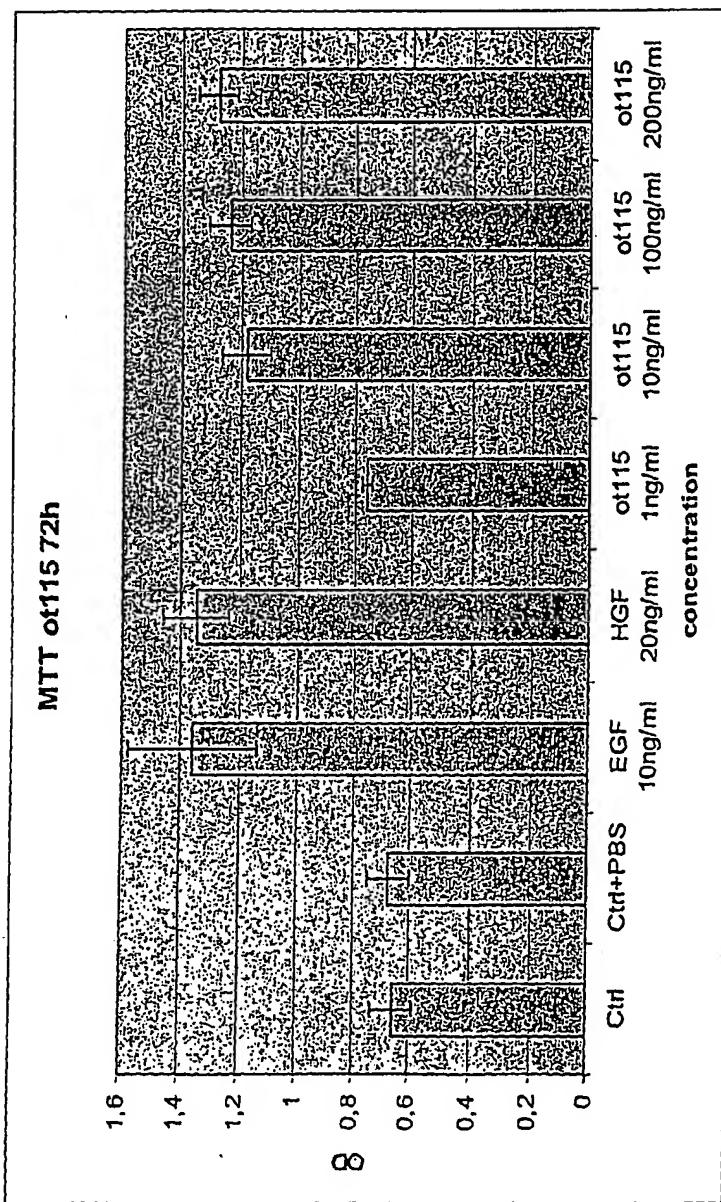
Fig. 7



Figur 8a



Figur 8b



Figur 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.